

**Fraktionierung von Serumeiweiß
durch Ammoniumvanadat**

Parviz Mochkrize

Aus dem Laboratorium (Leiter: Prof. Dr. Dr. K. Dirr) der
2. Medizinischen Universitätsklinik München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel)

Fraktionierung von Serumeiweiß
durch Ammoniumvanadat

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Parviz Mochkrize
aus
Teheran/Iran



1958

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Professor Dr. Dr. Dirr

Dekan: Professor Dr. Bürgeler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1958.

III

Gliederung

- I. Einleitung
 - A. Die Proteine
 - B. Allgemeines über die Bedeutung der Elektrophorese
 - C. Über die Eigenschaften des Vanadiums
- II. Fraktionierung von Serumeiweiß durch Ammoniumvanadat bei verschiedenen Konzentrationen unter Veränderung der pH-Werte:
 - A. Methodik
 - B. Ergebnisse mit Tabelle und Kurven:
 - 1. Unverdünntes menschliches Mischserum
 - 2. Verdünntes menschliches Mischserum
 - 3. Fraktionierung von pathologischen Seren mit Ammoniumvanadat
- III. Fraktionierung und Identifizierung der durch Fällung mit Ammoniumvanadat isolierten Serumfraktionen durch Elektrophorese.
 - A. Versuchsanordnung
 - B. Ergebnisse
- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Professor Dr. Dr. Dirr

Dekan: Professor Dr. Bürgeler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1958.

Gliederung

- I. Einleitung
 - A. Die Proteine
 - B. Allgemeines über die Bedeutung der Elektrophorese
 - C. Über die Eigenschaften des Vanadiums
- II. Fraktionierung von Serumeiweiß durch Ammoniumvanadat bei verschiedenen Konzentrationen unter Veränderung der pH-Werte:
 - A. Methodik
 - B. Ergebnisse mit Tabelle und Kurven:
 - 1. Unverdünntes menschliches Mischserum
 - 2. Verdünntes menschliches Mischserum
 - 3. Fraktionierung von pathologischen Seren mit Ammoniumvanadat
- III. Fraktionierung und Identifizierung der durch Fällung mit Ammoniumvanadat isolierten Serumfraktionen durch Elektrophorese.
 - A. Versuchsanordnung
 - B. Ergebnisse
- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung

I. Einleitung

A. Die Proteine

Die Bausteine der Eiweißkörper sind Aminosäuren, welche peptid-artig aneinandergereiht sind. Die Proteine tragen an ihren Seitenketten saure und basische Gruppen. Diese Seitenketten sind auch für die Fett- bzw. Wasserlöslichkeit sowie für die Bindungen der Proteinhauptketten untereinander verantwortlich. Teils sind diese Bindungen echte chemische, auf Grund von Salz- oder Esterbildung und H^+ -Brücken, teils werden die Hauptketten durch "van der Waal'sche" Kräfte zusammengehalten. Die genaue Anordnung der Aminosäuren und ihre Reihenfolge in den einzelnen Proteinkörpern kennt man erst in wenigen Eiweißkörpern, z. B. in Insulin.

Nach Pauling und Corey (1) ist die Polypeptidkette (= primäre Struktur) der Proteine schraubenförmig gewunden (= sekundäre Struktur), wobei Wasserstoffbrücken zwischen jeder Amidgruppe und ihrer drittnächsten bestehen. Im Gegensatz zu den Faserproteinen ist bei den globulären Proteinen die " α -Proteinhelix" nochmals in vielfältiger Weise in sich verknäult, wobei durch die Wechselwirkung der Aminosäureseitenketten ziemlich stabile Konfigurationen entstehen (= tertiäre Struktur).

Schon frühzeitig hatte man erkannt, daß es gelingt, durch Aussalzung mit Neutralsalzen unterschiedlicher Konzentrationen das Serumeiweiß in verschiedene Fraktionen aufzuteilen. Auf Grund dieser Fraktionierung unterscheidet man zwischen Albuminen und Globulinen und die letzteren werden nach der alten Nomenklatur aufgeteilt in Euglobuline und Pseudoglobuline I und II. Während die Albumine durch Kristallisation rein gewonnen werden können, erwies sich dies bei den Globulinen wegen ihrer höheren Molekülgröße als unmöglich. Bei den verschiedenen Unterfraktionen der Globuline handelt es sich nicht nur um verschiedene Aggregate des gleichen Grundmoleküls, sondern auch um andersartige Molekülstrukturen, wie z. B. um die mit der Elektrophorese differenzierten β -Globuline, welche Lipide eingebaut enthalten.

Von den Aufgaben, die die Proteine im Organismus zu erfüllen haben, kennen wir heute schon die groben Umrisse; so wissen wir, daß Proteine wichtige Energielieferanten sind; sie kommen auch als Gerüstsubstanzen in den Zellen vor. Die Serumeiweißkörper sind verantwortlich für den Transport von Stoff-

fen, sie regulieren den kolloid-osmotischen Druck und halten durch ihre Pufferwirkung den pH-Wert des Blutes konstant. Außerdem sind viele Farbstoffe, wie z. B. das Hämoglobin Eiweißkörper mit einer farbtragenden, prosthetischen Gruppe. Auch die Fermente sind Eiweiß-Verbindungen mit einer aktiven Gruppe.

Die Einteilung der Eiweißkörper ist heute noch weitgehend willkürlich, da wir ihren feineren Bau noch nicht genügend kennen. Über viele chemische und physikalische Daten der verschiedenen Eiweiße hat uns jedoch die Untersuchung mit der Ultrazentrifuge und die Elektrophorese Auskunft gegeben, auf die sich die Einteilung stützt. So sind beispielsweise die Albumine dadurch ausgezeichnet, daß sie der Kugelform sehr nahe kommen und eine große Wasserlöslichkeit besitzen. Allerdings muß man damit rechnen, daß die Albumine keine einheitlichen Eiweißkörper sind, sondern vielmehr aus mehreren Komponenten zusammengesetzt sind, was schon dadurch deutlich zum Ausdruck kommt, daß sie bei einem pH-Wert von 4 im elektrischen Feld in zwei Fraktionen wandern. Bei der Papierelektrophorese werden die Globuline in vier verschiedene Gruppen aufgespalten. Mit den Globulinen wandern viele zusammengesetzte Eiweißkörper. Auch die Antikörper wandern mit den Globulinen. Haben uns die modernen Untersuchungsmethoden auch manches über die Proteine zu erkennen gegeben, so gelang es besonders in den letzten 10 Jahren, vor allem mit Hilfe einiger neuentwickelter Methoden, weitere Einblicke in die Zusammensetzung der Proteine zu gewinnen.

Drei Arbeitsverfahren nehmen diesbezüglich eine besondere Stellung an. Sie befassen sich alle mit der Zerlegung des Plasmas oder Serums in Fraktionen: (die Methoden ergänzen sich gegenseitig)

1. Bestimmung der Molekulargewichte mit der Ultrazentrifuge, erstmals von Svedberg (2) entwickelt.
Auch über Aggregatbildungen wurden mit diesem Verfahren Ergebnisse gewonnen.
2. Untersuchungen über die Löslichkeit der Proteine in wässrigen Lösungen mit ansteigenden Neutralsalzkonzentrationen oder alkoholischen Lösungen, wie sie erstmals von L. G. Cohn durchgeführt wurden. (3, 4)
3. Trennung der Proteine durch elektrischen Strom in der Elektrophorese von Tiselius (5).

Mit den durch die vorstehenden Verfahren gewonnenen Proteinfractionen kann man durch chemische Analyse ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmen.

Elektrophorese und Ultrazentrifuge haben eine neue Unterteilung der Globuline entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bzw. Schwerfeld ermöglicht. Es wurden dadurch Aufschlüsse gewonnen über die Ladung sowie über die Größe der untersuchten Eiweißkörper. Im Elektrophorese-diagramm gelingt es in eleganter Weise die Albumine von den Globulinen abzutrennen und letztere in drei Hauptfraktionen, die α , β und γ Globuline mit Unterfraktionen aufzuteilen. Versuchsergebnisse mit der Ultrazentrifuge und chemischphysikalische Methoden haben gezeigt, daß es sich bei den durch Elektrophorese gewonnenen Fraktionen keineswegs um einheitliche Eiweißkörper handelt. Die vorgetäuschte Einheitlichkeit wird lediglich durch die elektrische Ladung bestimmt. Mit Hilfe der Äthanolfraktionierung ist es vor allem Cohn, Edsall und Mitarbeitern (6) gelungen, bestimmte Eiweißkörper aus den Globulinfraktionen zu trennen und ihre Bedeutung aufzuklären.

B. Allgemeines über die Bedeutung der Elektrophorese

Als Untersuchungsmethode für die Klinik ist die Elektrophorese heute beinahe unentbehrlich geworden. Sie gibt durch eine einfache und billige Versuchsanordnung die Möglichkeit, sich relativ schnell und für klinische Belange hinreichend genau ein Bild über die Zusammensetzung der Eiweißstoffe der verschiedensten Körperflüssigkeiten zu verschaffen. Die größte Bedeutung besitzt sie zweifellos für die Untersuchung der Zusammensetzung der Serumeiweißkörper. Darüber hinaus ist es möglich, die Eiweißkörper des Liquors, die pathologischen Eiweißverhältnisse im Urin, Exudate und Transudate in den verschiedensten Körperhöhlen, Blasenmhalte, ja überhaupt jede Eiweißlösung auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen. Gelingt dies beim Blutserum ohne weiteres, so zwingt oft der geringe Gehalt an Eiweißkörpern im Urin und Liquor diese Körperflüssigkeiten vorher einzuengen. Hierzu wird man deshalb gezwungen, weil einmal diese geringen Eiweißmengen elektrophoretisch kein klares Bild ergeben, andererseits muß man aber ein begrenztes Flüssigkeitsvolumen benützen. Im wesentlichen beruhen die Anreicherungsverfahren auf einer schonenden Fällung der Eiweißkörper oder aber auf einer Entfernung der Flüssigkeit. Zur Fällung benutzt man Azeton-Alkohol oder ein Gemisch von Alkohol und Äther. Das Abfiltrieren geschieht dadurch daß man unter einem eiweißdichten Filter ein Vakuum anlegt und so das Wasser absaugt.

Im Verlaufe pathologischer Prozesse gehen im Organismus tiefgreifende Ver-

änderungen im Aufbau und in der Zusammensetzung der Serumproteine vor sich; deren Erforschung ist sowohl für die Diagnostik vieler Krankheiten, als auch rückschließend zum Erkennen der pathologischen Vorgänge außerordentlich wichtig.

Das Elektrophoresediagramm läßt bei einer Reihe von pathologischen Prozessen charakteristische Veränderungen erkennen. Diese werden auch in verschiedenen Labilitätsreaktionen erfaßt, von denen sich heute in der Klinik vor allem die Reaktion nach Weltmann, die Takatareaktion, der Cadmiumtest und der Thymoltrübungstest weitgehend durchgesetzt haben. Die Labilitätsreaktionen beruhen darauf, daß verschiedene zugesetzte Stoffe mit Seren von abnormer Zusammensetzung mit verminderter oder erhöhter Labilität reagieren und früh oder später zu einer Trübung bzw. Ausfällung der Proteine führen. Es besteht großes Interesse, die Mechanismen dieser Labilitätsreaktionen aufzuklären, nicht nur im Hinblick auf die Möglichkeit und Grenzen ihrer chemischen Eigenschaften, sondern möglicherweise auch hinsichtlich der pathologisch veränderten Eiweißkörper selbst.

Da es wichtig ist, die Beziehungen zwischen den bei einzelnen Krankheiten vermehrten oder verminderten Konzentrationen der Proteinfractionen zu wissen, erlangen heute die analytischen Serumproteinaufgliederungsmethoden in steigendem Maße Bedeutung. Dabei steht die Elektrophorese nach Tiselius an erster Stelle und gilt als diejenige Methode, auf die alle anderen, im Prinzip gleich arbeitenden, wie die Papierelektrophorese, als Standard bezogen werden (7). Neben der Verwendung als klinische Untersuchungsmethode besitzt die Elektrophorese auch eine hervorragende Bedeutung für die Forschung. So lassen sich die elektrophoretisch getrennten Fraktionen des Eiweißes weiter verwenden. Durch Herausschneiden und Extrahieren einzelner Fraktionen des Papierelektrophoresestreifens läßt sich nach Hydrolyse durch chemische Analysen z. B. Papierchromatographie, die Aminosäurezusammensetzung feststellen.

Die ehemals üblichen Aussalzungsverfahren treten heute in den Hintergrund. Bereits vor 10 Jahren hat Weihe versucht, durch den Cadmiumsulfat-Trübungstest nach Wuhrmann-Wunderly (8) (unveröffentlichte Versuche) Schwermetalle für die Fraktionierung von Serumproteinen zu erproben.

In der vorliegenden Arbeit unternahmen wir den Versuch durch Ammoniummonovanadat Serumproteine zu fraktionieren. Durch Variation von pH und der Ammoniummonovanadat-Konzentration gelang es uns, auf einfache Weise verschiedene Fraktionen des Humanserums abzutrennen, die sonst nur durch

schwierige und langwierige Operationen dargestellt werden konnten. Als Grundlage zu den folgenden Versuchen arbeiteten wir ein quantitatives System aus, welches Aufschluß über die prozentualen Konzentrationen an Serumproteinen gibt, welche ungefällt geblieben waren, indem wir wechselnde Konzentrationen von Ammoniummonovanadat bei verschiedenen pH-Werten auf Serum einwirken ließen. Das Verfahren wurde auch bei pathologischen Seren auf seine Verwendungsfähigkeit in der klinischen Praxis geprüft.

C. Über die Eigenschaften des Vanadiums

Da das Vanadium ein verhältnismäßig ungeläufiges Element ist, sei es gestattet, einiges über dessen Chemie einzufügen. Vanadium bildet mit Vorliebe mehrkernige Oxokomplexe. Vanadinpentoxyd (V_2O_5) bildet ein braunrotes, wasserlösliches Pulver, welches mit Alkalihydroxyd Vanadate liefert. Oberhalb pH=11 enthält die farblose Lösung einfache Vanadate mit dem Anion VO_4^{3-} . Wenn man ansäuert, tritt Polymerisation zu Divanadaten $V_2O_7^{4-}$, Trivanadaten usw. ein, wobei die Lösung gleichzeitig eine gelbe Färbung annimmt. Bei der Reduktion (SO_2 , Zn-Metall usw.) gehen die gelben Polyvanadate in saurer Lösung in blaue Verbindungen mit IV-wertigem Vanadium über. Stärkere Reduktion liefert grüne V (III)-Salze und schließlich violett gefärbte V (II)-Salze. (G. Schwarzenbach (9)).

Wie aus diesen Eigenschaften des Vanadiums ersichtlich ist, dürfen wir in dieser Arbeit nicht von Ammoniummonovanadat NH_4VO_3 reden, sondern allgemein von Ammoniumvanadat, weil wir im Säurenbereich arbeiten müssen und hier nur Polyvanadate existieren.

II. Fraktionierung von Serumeiweiß durch Ammoniumvanadat bei verschiedenen Konzentrationen unter Veränderung der pH-Werte

A. Methodik

Eiweißausfällung

Die Fällung von Eiweiß aus menschlichem Mischserum mit Ammoniumvanadat erfolgt nach folgender Methode:

2 ccm Serum
+ 8 ccm Ammonium-Vanadat
(0,5 bis 0,05 %)

+ 2 ccm aus einer Säureverdünnungsreihe,
welche mit 0,4 n HCl hergestellt wird. Säureverdünnungsreihe mit 0,4 n HCl:

0,4 n HCl: 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5 bis 0 ccm
aqua dest. ad: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 bis 10 ccm
2 ccm

Die Salzsäure wird in Form obiger Lösungen zur Einstellung der Wasserstoffionen-Konzentrationen verwendet. Die jeweils resultierende Wasserstoffkonzentration wird mit der Glaselektrode bestimmt.

Serumeiweiß fällt bei dieser Methode in sauren pH-Bereichen, im Alkalischen (durch Zugabe von NaOH statt HCl) tritt keine Eiweißfällung auf.

Nachdem die Mischung gut geschüttelt ist, wird scharf zentrifugiert (etwa 25 Minuten), das Überstehende wird vom Niederschlag abgegossen und in dieser Lösung das pH gemessen, worauf eine Bestimmung des ungefällten Eiweißes erfolgt. Nach der pH-Bestimmung werden je 5 ccm davon mit 5 ccm Perchlorsäure versetzt (6 %), welche das Serumeiweiß, das durch Ammonium-Vanadat nicht erfaßt wird, quantitativ zur Ausfällung bringt. Das Gemisch wird gut, aber ohne Schaum zu entwickeln, geschüttelt und hierauf scharf zentrifugiert (etwa 15 Minuten). Nach dem Zentrifugieren wird das Überstehende vom Niederschlag abgegossen und der Niederschlag nach folgender Weise verarbeitet:

Niederschlag
+ 4 ccm aqua dest.
+ 5 ccm NaOH (1 %)

Durch kräftiges Rühren mit dem Glasstab löst sich der Eiweiß-Perchlorsäure-Niederschlag vollkommen auf.

Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgt nach der Vorschrift zum Photometer EPPENDORF.

Ansatz für die Kolorimetrie:

Filter: 546 m μ Hg
Küvetten: 20 mm Schichtdicke
1 ccm der Lösung aus dem Niederschlag
+ 4 ccm aqua dest.
+ 5 ccm Biuretreagenz

30 Minuten nach dem Ansetzen wird gegen den Blindwert kolorimetriert und die Farbtiefe als Extinktion (= Σ) abgelesen.

Blindwert 4 ccm aqua dest.
+ 5 ccm NaOH (1 %)

Davon wird wieder 1 ccm entnommen,
+ 4 ccm aqua dest.
+ 5 ccm Biuretreagenz.

Zur Herstellung der Biuretreagenz wird eine Vorschrift verwendet, die im Krankenhaus EPPENDORF ausgearbeitet wurde:

Aus einer gesättigten Natronlauge, die von unlöslichem Natriumkarbonat vorsichtig dekantiert wurde, stellt man zunächst eine 0,2 n Lauge her. In etwa 400 ccm der 0,2 n Natriumlauge werden 9 g Kaliumnatriumtartarat (Seignettesalz) und danach 3 g feinst gepulverten Kupfersulfats vollständig in Lösung gebracht. Erst dann setzt man 5 g Kaliumjodid zu und füllt mit 0,2 n Lauge auf 1000 ccm auf (in brauner Flasche mit Gummistopfen aufzubewahren).

Bei dieser Eiweißbestimmung wurde mit unbehandeltem Serum, d.h. ohne Fällungsmittel die Extinktion $33 (+ 1-2 \%) = 100 \%$ erhalten. Die Ergebnisse der photometrischen Messungen werden dann als Prozente des ungefällten Proteins in ein Koordinatensystem gegen das pH als Abszisse eingetragen.

Zusammenfassung der Methodik

1. Fällung

2 ccm Serum
+ 8 ccm Ammonium-Vanadat
+ 2 ccm Säuregemisch
25 Minuten zentrifugieren, am Überstehenden pH messen.

2. Abtrennung der ungefällten Proteine

Vom Überstehenden: 5 ccm
+ 5 ccm Perchlorsäure
15 Minuten zentrifugieren. Die Überstände, die kein Eiweiß mehr
enthalten, werden abgegossen.

3. Lösung des Niederschlages von 2.)

Niederschlag auflösen:
Niederschlag + 4 ccm H_2O
+ 5 ccm NaOH (1 %)

4. Eiweißbestimmung in 3.)

Vom gelösten Niederschlag je:
1 ccm
+ 4 ccm H_2O
+ 5 ccm ~~Eiweiß~~reagenz.
dann kolorimetrieren.

Die Seren, die für die Fällung von Serumeiweiß mit Ammonium-Vanadat verschiedener Konzentrationen verwendet wurden, hatten konstante Refraktometerwerte. Der Wert für den Eiweißgehalt des Serums, welches für den Ansatz verwendet wird, wird außerdem auf folgende Weise bestimmt:

1. 2 ccm Serum
+ 10 ccm aqua dest.
2. 5 ccm von 1.)
+ 5 ccm Perchlorsäure (6 %)
scharf zentrifugieren.

3. Niederschlag

+ 4 ccm aqua dest.

+ 5 ccm NaOH (1 %)

durch kräftiges Rühren quantitativ lösen.

4. 1 ccm vom gelösten Niederschlag

+ 4 ccm aqua dest.

+ 5 ccm Biuretreagenz

gegen den Blindwert kolorimetrieren.

B. Ergebnisse

1. Unverdünntes menschliches Mischserum

Ammonium-Vanadat wurde in verschiedenen Konzentrationen und unter Veränderung des pH-Wertes durch Zufügung von verdünnter Salzsäure auf unverdünntes menschliches Mischserum angewendet, wobei ein Eiweiß-Ammonium-Vanadatkomplex ausfällt. Im Überstehenden dieser Niederschläge wird das Eiweiß bestimmt, welches durch das Fällungsmittel nicht erfaßt wurde.

In 6 Meßreihen (Abb. 1) setzten wir zu je 2 ccm Mischserum im 12 ccm Ansatz 4 - 40 mg Ammonium-Vanadat hinzu. Die Proteinausgangskonzentration wurde in diesen Meßreihen konstant gehalten. Auf 1 ccm Serum entfielen nun in den erwähnten Meßreihen 2 - 20 mg Ammonium-Vanadat.

Die folgenden Tabellen und die daraus aufgestellten Kurven der Abb. 1 zeigen, daß das Serumeiweiß nur dann vollständig ausgefällt wird, wenn mit 0,5 %igem Ammonium-Vanadat das pH 2,2 - 4,6, mit 0,4 %igem Ammonium-Vanadat das pH 2,7 - 4,6 und mit 0,3 %igem Ammonium-Vanadat das pH 3,7 - 4,9 ist. Ist die Ammonium-Vanadatkonzentration geringer als 0,3 %, dann ist es innerhalb keines pH-Bereiches möglich, 100 % des Serumeiweißes auszufällen. Mit steigender Ammonium-Vanadatkonzentration wird also der pH-Bereich für 100 %ige Fällung des Proteins breiter, bei fallender Konzentration strebt dieser Bereich dem Nullwert zu. Andererseits ist es nicht von Interesse, Ammonium-Vanadatkonzentrationen von über 0,5 % zu verwenden, da unter pH 2 Denaturierung eintritt. Wegen der stark variierenden Werte, die sich im pH-Bereich unter 2,5 ergaben und die abhängig waren vom pH und der Ammonium-Vanadat-Konzentration, denn das Serumprotein wird in diesem pH-Bereich leicht denaturiert, war es notwendig, die Versuche öfters zu wiederholen, um annähernd übereinstimmende Werte zu erhalten,

und auf der alkalischen Seite keine besonderen Ergebnisse zu erwarten sind.

Tabelle I

Fällungsmittel: 0,5 %iges Ammonium-Vanadat

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,0	27,5	83,3	2,1	1,5	4,5	5,1	22,0	66,6
1,1	27,0	81,8	2,2	0,5	1,5	5,3	25,0	75,7
1,2	26,0	78,7	2,2	0	0	5,4	26,0	78,7
1,3	25,5	77,2	bis	-	-	5,5	27,0	81,8
1,4	24,5	74,2	4,6	0	0	5,6	28,0	84,8
1,5	23,5	71,2	4,7	1,0	3,0	5,7	28,5	86,3
1,7	20,5	62,1	4,8	2,5	7,5	5,9	30,0	90,9
1,8	17,5	53,0	4,9	12,5	37,8	6,1	31,5	95,4
2,0	3,5	10,6	5,0	20,0	60,6	6,6	33,0	100,0

Tabelle II

Fällungsmittel: 0,4 %iges Ammonium-Vanadat

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,1	32,5	98,4	1,9	26,5	80,3	4,9	10,0	30,3
1,2	31,5	95,4	2,2	21,0	63,6	5,1	19,5	59,0
1,3	31,0	93,9	2,3	16,0	48,4	5,4	25,0	75,7
1,4	30,5	92,4	2,4	13,0	39,3	5,8	28,5	86,3
1,5	30,0	90,9	2,5	2,5	7,5	6,0	30,0	90,9
1,6	31,0	93,9	2,6	1,5	4,5	6,2	31,0	93,9
1,6	30,5	92,4	2,7	0	0	6,6	33,0	100,0
1,7	30,0	90,9	bis	-	-	7,2	33,0	100,0
1,8	28,5	86,3	4,6	0	0	7,6	33,0	100,0
1,8	29,5	89,3	4,8	1,0	3,0			

Tabelle III

Fällungsmittel: 0,3 %iges Ammonium-Vanadat

pH	Σ	Eiweiß %	pH	Σ	Eiweiß %	pH	Σ	Eiweiß %
1,8	33,0	100,0	3,0	23,0	69,6	5,9	28,0	84,8
1,8	33,0	100,0	3,2	13,5	40,9	5,9	28,5	86,3
1,9	33,0	100,0	3,6	2,0	6,0	6,1	30,5	92,4
2,1	33,0	100,0	3,8	0	0	6,1	30,0	90,9
2,3	32,5	98,4	4,6	0	0	6,4	32,0	96,9
2,4	32,5	98,4	4,8	0	0	6,5	32,5	98,4
2,4	32,0	96,9	5,1	18,5	56,0	7,2	33,0	100,0
2,5	31,5	95,4	5,2	20,5	62,1	7,4	33,0	100,0
2,6	30,5	92,4	5,4	23,0	69,6			
2,8	29,0	87,8	5,5	24,0	72,7			

Tabelle IV

Fällungsmittel: 0,2 %iges Ammonium-Vanadat

pH	Σ	Eiweiß %	pH	Σ	Eiweiß %	pH	Σ	Eiweiß %
1,4	33,0	100,0	3,5	29,0	87,8	5,5	21,5	65,1
1,8	33,0	100,0	3,6	28,5	86,3	5,9	27,0	81,8
2,1	33,0	100,0	4,2	5,5	16,6	6,0	28,0	84,8
2,2	33,0	100,0	4,3	4,5	13,6	6,2	30,0	90,9
2,4	33,0	100,0	4,9	4,5	13,6	6,8	33,0	100,0
2,5	33,0	100,0	5,0	7,0	21,2	6,9	33,0	100,0
2,7	32,5	98,4	5,2	15,0	45,4	7,1	33,0	100,0
3,0	32,0	96,9	5,2	16,5	50,0	7,3	33,0	100,0

Tabelle V

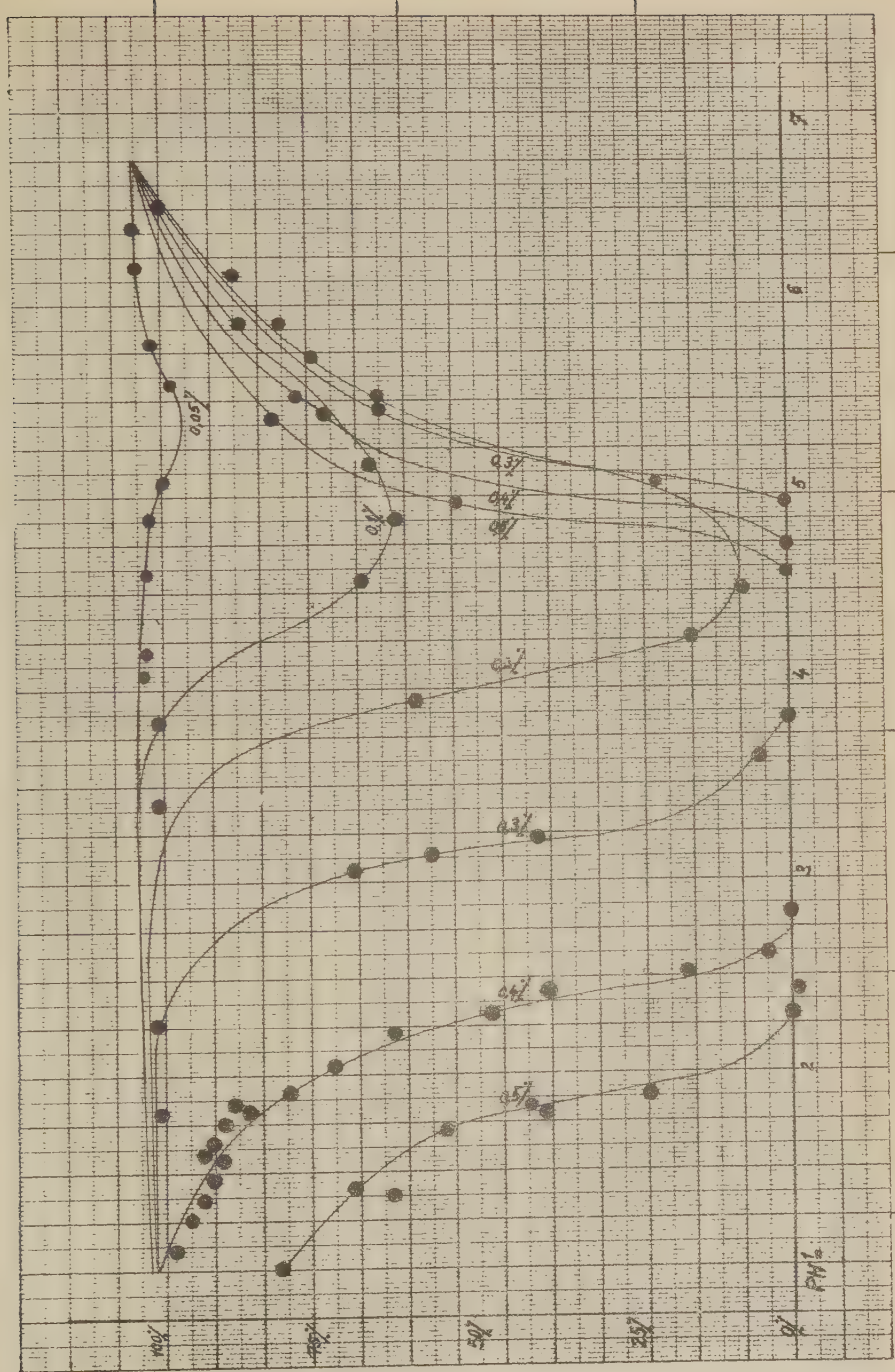
Fällungsmittel: 0,1 %iges Ammonium-Vanadat

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,5	33,0	100,0	3,4	33,0	100,0	5,8	29,0	87,8
1,8	33,0	100,0	3,5	33,0	100,0	5,9	29,5	89,3
2,0	33,0	100,0	3,6	33,0	100,0	6,2	31,5	95,4
2,1	33,0	100,0	3,8	33,0	100,0	6,4	32,0	96,9
2,2	33,0	100,0	4,3	27,5	83,3	6,5	32,5	98,4
2,2	33,0	100,0	4,5	22,5	68,1	6,7	33,0	100,0
2,4	33,0	100,0	4,7	20,5	62,1	7,2	33,0	100,0
2,6	33,0	100,0	5,1	22,0	26,6	7,4	33,0	100,0
2,9	33,0	100,0	5,5	26,5	80,3			
3,3	33,0	100,0	5,6	27,0	81,8			

Tabelle VI

Fällungsmittel: 0,05 %iges Ammonium-Vanadat

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,2	33,0	100,0	3,5	33,0	100,0	5,8	32,5	98,4
1,4	33,0	100,0	3,8	33,0	100,0	6,2	33,0	100,0
1,5	33,0	100,0	4,1	33,0	100,0	6,4	33,0	100,0
1,8	33,0	100,0	4,2	32,7	99,2	6,6	33,0	100,0
1,9	33,0	100,0	4,6	32,7	99,2	6,8	33,0	100,0
2,1	33,0	100,0	4,7	32,7	99,2	7,1	33,0	100,0
2,2	33,0	100,0	4,9	32,5	98,4	7,3	33,0	100,0
3,0	33,0	100,0	5,1	32,0	96,9			
3,4	33,0	100,0	5,5	31,5	95,4			



2. Verdünntes menschliches Mischserum (Versuchsanordnung siehe Seite 6)

Wir haben bei den Versuchsreihen mit unverdünntem Serum, die mit konstanter Proteinkonzentration ausgeführt wurde, die Ammonium-Vanadat-Konzentration (0,5 - 0,05 %) und das pH variiert. Unter Anwendung verschiedener Verdünnungen von Serum mit aqua dest. 1 : 0-4 (entsprechend 2, 1, 0,66, 0,5 und 0,4 ccm Mischserum pro 40 mg Ammonium-Vanadat im 12 ccm Ansatz) und einer konstanten Ammonium-Vanadat-Konzentration von 0,5 % ergab sich das aus Abbildung 2 ersichtliche System. Die Kurve, die das Verhalten des unverdünnten Serums beschreibt, ist mit der aus Tabelle I mit 0,5 %igem Ammonium-Vanadat hergestellten identisch. Sie entspricht der Verdünnung 1 : 0.

Die Versuche mit abnehmender Proteinkonzentration und gleichbleibenden Mengen Ammonium-Vanadat zeigen, daß über pH 2,2 bei gleicher Wasserstoffionenkonzentration prozentual die gleichen Eiweißmengen gefällt werden, daß also die Konzentration des dem Vanadation angebotenen Eiweißes keine Rolle spielt. Das ist besonders aus Abb. 3 zu entnehmen, auf welcher die Konzentration des Serums gegen die Menge Eiweiß aufgetragen ist, die nach Fällung mit 0,5 %igem Ammonium-Vanadat noch in Lösung geblieben ist:

Unter pH 4,6 fällt mit allen untersuchten Verdünnungen alles Eiweiß aus, im Gegensatz zum unverdünnten Serum, wo unter pH 2,2 wieder Eiweiß in Lösung bleibt, was die einzige Kurve auf der linken Seite von Abb. 2 veranschaulicht. Die Ursache für das Fehlen der entsprechenden Äste der Verdünnungskurven ist nicht bekannt.

Tabelle VII

Fällungsmittel: 0,5 %iges Ammonium-Vanadat mit 1 : 1 verdünntem menschlichen Mischserum

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,5	0	0	5,5	13,0	78,7	6,3	16,2	98,4
bis	-	-	5,8	14,5	87,8	7,1	16,5	100,0
3,8	0	0	6,2	15,5	93,9	7,2	16,5	100,0
4,9	6,0	36,3	6,3	16,0	96,9			

Tabelle VIII

Fällungsmittel: 0,5 %iges Ammonium-Vanadat mit 1 : 2 verdünntem menschlichen Mischserum

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,6	0	0	5,5	9,0	81,8	6,8	11,0	100,0
bis	-	-	6,1	9,7	88,6	7,4	11,0	100,0
4,1	0	0	6,2	10,2	93,1			
5,0	6,0	54,5	6,3	10,3	93,6			

Tabelle IX

Fällungsmittel: 0,5 %iges Ammonium-Vanadat mit 1 : 3 verdünntem menschlichen Mischserum

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,7	0	0	5,5	7,5	90,9	6,3	8,2	100,0
bis	-	-	6,1	8,0	96,9	6,6	8,2	100,0
4,8	2,0	24,2	6,2	8,2	100,0	7,3	8,2	100,0

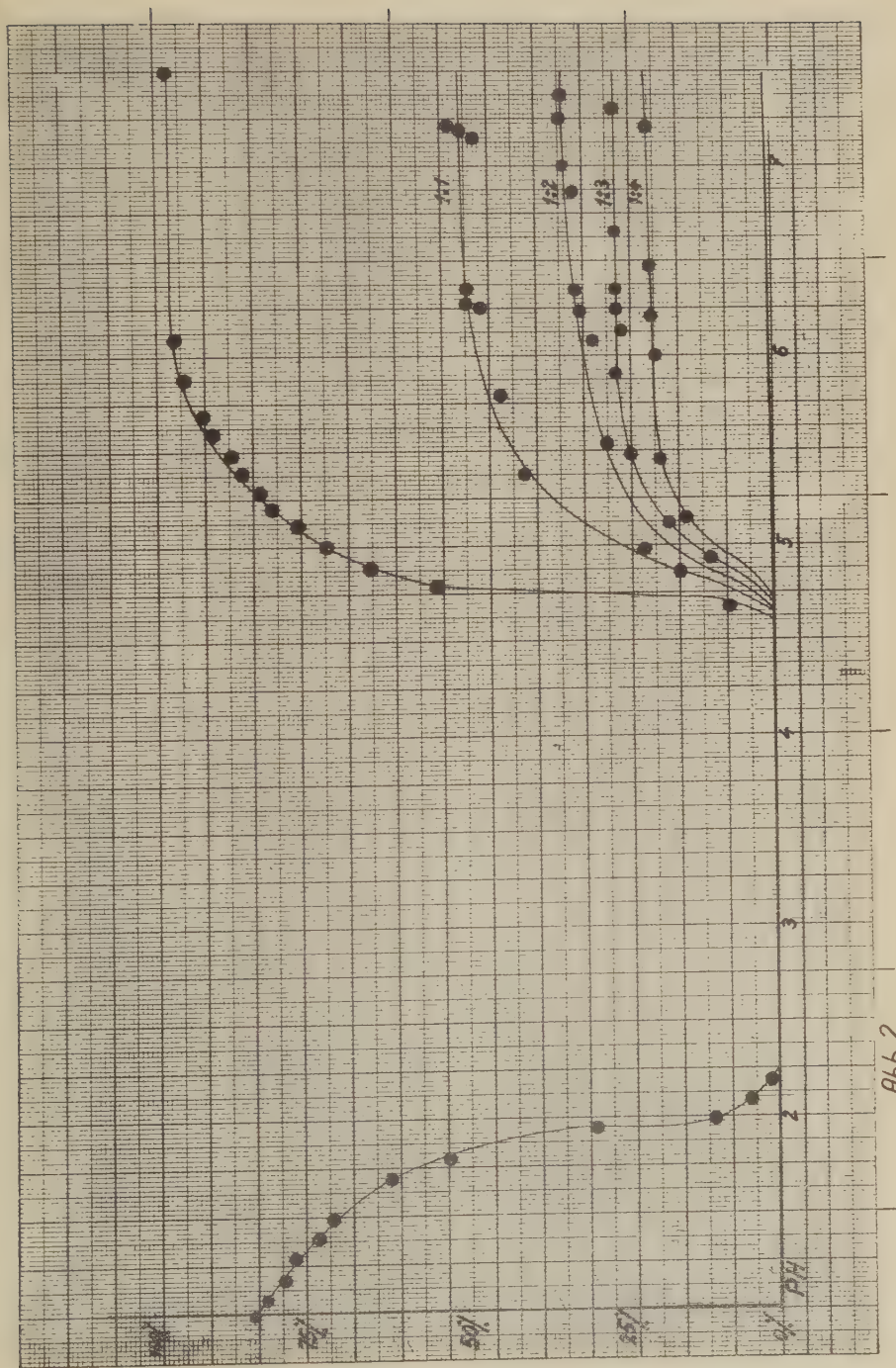


Abb. 2

Abb. 3

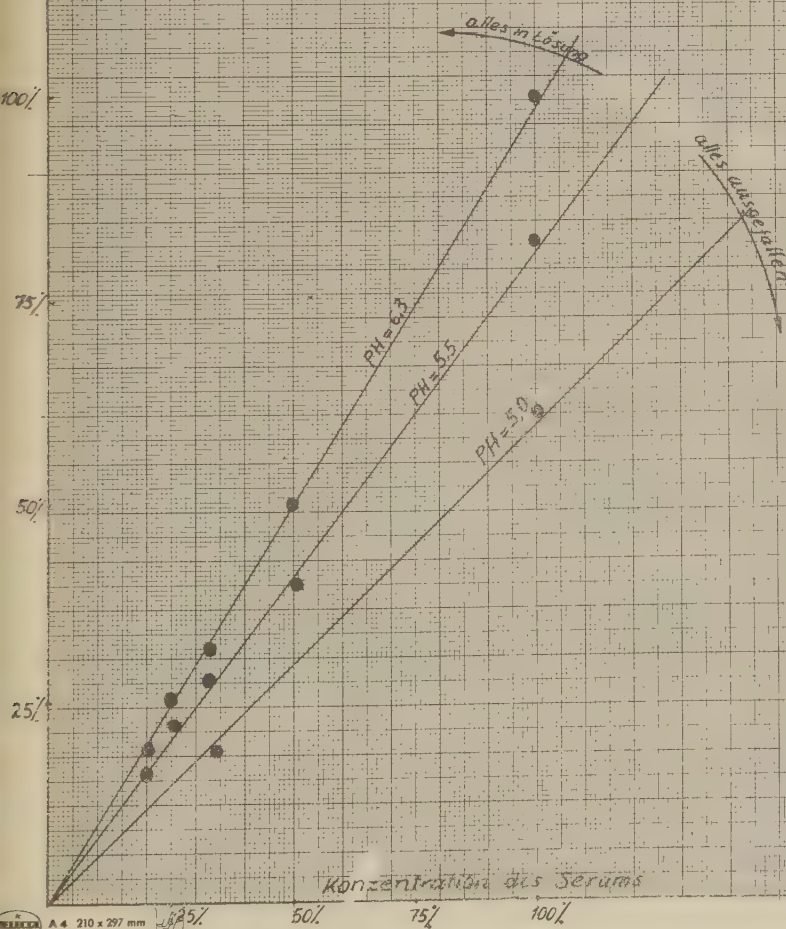


Tabelle X

Fällungsmittel: 0,5 %iges Ammonium-Vanadat mit 1 : 4 verdünntem menschlichen Mischserum

pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %	pH	ξ	Eiweiß %
1,6	0	0	5,1	4,5	68,1	6,5	6,5	98,4
bis	-	-	6,0	5,9	89,3	7,2	6,6	100,0
4,2	0	0	6,2	6,4	96,9			

3. Fraktionierung von pathologischen Seren mit Ammonium-Vanadat

Dirr, Decker und Becker ⁺⁾ erhielten in diesem Labor bei ihren Versuchen über die Eiweißfällung ähnliche Kurven mit Uranylazetat, wie wir sie unter Anwendung von Ammonium-Vanadat erhalten hatten. Sie fanden charakteristische Unterschiede zwischen den Reaktionsweisen von Mischserum und pathologischen Seren, vor allem von γ -Plasmocytomseren.

Aus diesem Grunde lag es nahe, daß auch bei der Fällung mit Ammonium-Vanadat solche oder ähnliche Unterschiede auftreten würden, die vielleicht auf eine Stabilitätsveränderung der Serumkolloide oder der Komplexe der Proteine mit Ammonium-Vanadat bei pathologischen Veränderungen zurückzuführen wären.

Deshalb untersuchten wir die Seren von γ -Plasmocytom, Leberzirrhose, Endocarditis lenta, Hypercholesterinaemie und einen vermutlichen Fall von α_2 -Plasmocytom. Von diesen pathologischen Seren steht nur ein kleines Quantum jeweils zur Verfügung, deshalb mußten wir uns mit lediglich 3 oder 4 Punkten für die Aufstellung einer Kurve begnügen, im Gegensatz zu 30 und mehr Punkten für eine Kurve mit Mischserum, von dem wir für eine Versuchsreihe mindestens 40 - 60 ccm benötigten.

Bei der Fraktionierung der genannten pathologischen Seren mit Ammonium-Vanadat konnten wir entgegen aller Erwartungen keine Abweichung gegenüber dem Mischserum feststellen.

⁺⁾ im Druck

III. Fraktionierung und Identifizierung der durch Fällung mit Ammonium-Vanadat isolierten Serumfraktionen durch Elektro- phorese

Das Hauptziel unserer Arbeit war die Isolierung und Reindarstellung von Serumproteinfraktionen für klinische Anwendungen. Diese Hoffnung, zu solchen zu gelangen, war umsomehr gerechtfertigt, da es Dirr, Decker und Becker gelungen war, mit Uranylazetat durch Verschiebung des Fällungs-pH elektrophoretisch reines α_2 - und γ -Globulin zu isolieren.

Um einen Überblick über das ganze System zu erhalten, haben wir an 4 Punkten jeder der 6 Kurven der Abb. 1 je 4 verschiedene Elektrophoresen durchgeführt, und zwar je 3 verschiedene Versuchs- bzw. Vergleichsformen aus dem Niederschlag und 1 aus dem Überstehenden, wie unten noch näher ausgeführt wird. Wir hielten es für günstig, jeweils eine der beiden Fraktionen genau zu untersuchen, deshalb machten wir vom Niederschlag 3 verschiedene Elektrophoresen, davon 2 mit Mischserum zum Vergleich auf einem Streifen, und jeweils nur 1 Elektrophorese in der herkömmlichen Form vom Niederschlag und vom Überstehenden. Es wäre wohl interessant und gerechtfertigt gewesen, alle quantitativ erfaßten Punkte der 6 Kurven (Tab. 1-6) auch qualitativ mittels der Elektrophorese zu untersuchen. Da man für jeden Versuch bei einmaliger Durchführung 4 Elektrophoresen benötigt, würde das bedeuten, daß mindestens 650 Elektrophoresen anzuführen wären, was bei den Einrichtungen unseres Labors nicht möglich ist. Allerdings sind die Elektrophoresen im stark sauren Milieu nicht von Interesse, da hier eine große Tendenz zur Denaturierung besteht.

A. Versuchsanordnung

Die Elektrophoresen wurden nach der Vorschrift von Grassmann und Hannig auf Streifen aus dem Filtrierpapier WHATMAN Nr. 2 in dem Veronalpuffer ELPHOR vom pH 8,6 in der von Grassmann beschriebenen Apparatur 10 bei einer Spannung von 110 Volt und einer Stromstärke von 0,1 bis 0,2 mm Amp. durchgeführt. Nachdem die Streifen getrocknet waren, wurden die getrennten Zonen mit dem von Grassmann und Hannig angegebenen Farbstoff Amidoschwarz sichtbar gemacht.

Der durch Fällung mit Ammoniumvanadat erzeugte Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren (25 Min.) durch Abgießen von der überstehenden Lösung

befreit, durch Zugabe von 1 %iger NaOH aufgelöst und war somit zur Elektrophorese bereit. Es hat sich als nicht nötig erwiesen, das Ammonium-Vanadat zu entfernen, da wir feststellen konnten, daß die Gegenwart von Ammonium-vanadat keinen Einfluß auf das Ergebnis der Elektrophorese ausübt.

Um in der abgegossenen, überstehenden Lösung eine Elektrophorese durchführen zu können, ist es notwendig, das Eiweiß auszureichern. Dies geschieht, indem nochmals 8 ccm 0,5 %iges Ammonium-Vanadat zugesetzt wird, wodurch sich das pH erhöht. Um wieder in den günstigen Fällungsbereich zu gelangen, der z. B. für 0,5 %iges Ammonium-Vanadat pH 1,8 - 4,7 beträgt, muß tropfenweise 0,4 n HCl hinzugegeben werden. Dieser Niederschlag wird nun durch Zentrifugieren isoliert, und in der überstehenden Lösung wird durch Zugabe von 6 %iger Perchlorsäure vorsichtshalber geprüft, ob alles Eiweiß sedimentiert war. Der Niederschlag wurde, wie oben beschrieben, mit verdünnter NaOH (1 %) gelöst und war dann zur Elektrophorese bereit.

Die so erhaltenen hochkonzentrierten Eiweißlösungen wurden in verschiedenen Weisen auf die Papierstreifen aufgetragen, um eine sichere Kontrolle über die quantitative Zusammensetzung und einen Vergleich mit der Eiweißzusammensetzung des Mischserums zu erreichen.

- 1) Im "Identifizierungsversuch" wurden nebeneinander, ohne sich gegenseitig zu überdecken, 0,01 mm³ Mischserum und 0,01 mm³ der zu untersuchenden Lösung aufgetragen.
- 2) Beim "Kontrollversuch" trugen wir auf die ganze Breite des Streifens 0,01 mm³ des Mischserums auf und im mittleren Drittel darüber dieselbe Menge der zu untersuchenden Lösung.
- 3) Im "Belegversuch" wurden 0,01 mm³ der zu untersuchenden Lösung auf die ganze Breite des Elektrophoresestreifens aufgetragen.

B. Ergebnisse

1) Mischserum bei pH 5,6 mit 0,05 %igem Ammonium-Vanadat

Die Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Elektrophoresestreifen von den Versuchen mit 0,05 %igem Ammonium-Vanadat bei pH 5,6. Aus Abbildung 4, in welcher im Identifizierungsversuch der Niederschlag dem Mischserum gegenübergestellt ist, ist deutlich ersichtlich, daß die Albumine, α_1 und α_2 -Globuline nicht ausgefällt wurden, und daß lediglich β und wenig der γ -Globuline unter diesen Bedingungen gefällt wurden. Abbildung 5, welche das Elektro-

pherogramm des Niederschlages darstellt, und Abbildung 6, mit dem Elektropherogramm der überstehenden Lösung, sind eine weitere Bestätigung. Aus Abb. 6 ist außerdem ersichtlich, daß nicht das gesamte β -Globulin ausgefällt wurde.

2) Mischserum bei pH 5,1 mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat

Die Abbildungen 7 - 9 sind Photographien von Elektrophoresestreifen, die mit Fraktionen von Versuchen mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat bei pH 5,1 erhalten wurden. Besonders aus dem Streifen mit der Elektrophorese des Überstehenden kann entnommen werden, daß unter diesen Bedingungen das Gamma-Globulin vollständig ausgefällt wird, die Anreicherung der Gamma-Globuline ist auf den Abbildungen 7 und 8, mit den Elektrophoresen des Niederschlages ganz deutlich, ebenso, daß hier das α_1 -Globulin fehlt, dessen Anreicherung in der überstehenden Lösung auf Abbildung 9 vielleicht weniger gut zu erkennen ist.

3) Mischserum bei pH 1,85 mit 0,5 %igem Ammonium-Vanadat

Abbildung 10, die den Identifizierungsversuch des Niederschlags im Vergleich mit unbehandeltem Mischserum wiedergibt, zeigt, daß das β -Globulin hier stark vermehrt ist, und das γ -Globulin vollkommen fehlt, also in Lösung geblieben ist.

4) Serum von Endocarditis lenta bei pH 5,2 mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat

Aus der Versuchsreihe mit dem Serum eines Falles von Endocarditis lenta (Patient Baumgartner) sind die Abb. 11, 12 und 13 wiedergegeben, aus denen genau die gleichen Ergebnisse wie mit Mischserum ersichtlich sind, vgl. Abbildungen 7 - 9 nämlich, daß im Niederschlag das γ -Globulin vermehrt ist und α_1 -Globulin fehlt, welche im Elektropherogramm der überstehenden Lösung in entsprechendem Ausmaß erscheinen; d. h., daß α_1 -Globulin vermehrt und γ -Globulin fehlt.

5) Serum von γ -Plasmocytom bei pH 5,0 mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat

Die Abbildungen 14, 15 und 16 zeigen die Elektrophoresen eines Serums einer γ -Plasmocytomkranken (Kaffl.). Obwohl diesmal bei einem pH gearbeitet wurde, das etwas niedriger war, als in 4), sind doch die Ergebnisse identisch, d. h. es konnte kein spezifischer Unterschied zwischen γ -Plasmo-

cytom-, Endocarditis lenta- und Mischserum gefunden werden.

6) Serum von Leberzirrhose bei pH 5,1 mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat

In den Abbildungen 17, 18 und 19 ist eine Versuchsreihe mit einem Leberzirrhoseserum (Patient Weiss) abgebildet. Das Versuchsergebnis ist wie bei 4) und 5).

7) Hypercholesterinaemieserum bei pH 5,2 mit 0,2 %igem Ammonium-vanadat

Auch die Abbildungen 20, 21 und 22, die mit einem Hypercholesterinaemieserum (Patient Kunard) erhalten wurden, zeigen dieselben Ergebnisse wie bei 4), 5) und 6) bei den vorangehenden Versuchen, die unter denselben Bedingungen ausgeführt wurden.

8) Vermutliches β -Plasmocytomserum bei pH 5,1 mit 0,2 %igem Ammonium-Vanadat

Auch das vom Patienten Roth, dessen Krankheitsbild offen ließ, ob es sich um einen Fall von β -Plasmocytum oder Osteomalazie handelte, untersuchte Serum Serum verhielt sich genau wie die oben beschriebenen Seren. (Abbildungen 23, 24 und 25.)

IV. Diskussion

Die früher üblichen Verfahren zur Proteinfractionierung durch Aus-salzen, von denen besonders das nach Butler und Montgomery be-kannt ist, bei dem mit Phosphatlösungen gearbeitet wird, treten heute in den Hintergrund, weil bereits vor 6 Jahren durch die Auffindung des Cadmium-sulfat-Trübungstestes durch Wuhrmann und Wunderly ein-Schwermetall zur Fractionierung von Serumproteinen zur Anwendung kam, und somit eine neue Art von Metallkomplexen zur Eiweißfractionierung herangezogen wurde. Auch die Fällung mit Uranylacetat wird heutzutage in der Klinik viel angewendet und wurde durch Dirr sogar zur technischen Gewinnung von Antitoxinseren vorgeschlagen. Andere Schwermetalle, z.B. Pb, zur Eiweißfällung werden in der Literatur wohl erwähnt, haben aber keine besondere Bedeutung erlangt. Lediglich durch Anwendung von CdCl_2 ist es Neubauer gelungen, das Albumin von den Serumglobulinen abzutrennen.

In den oben beschriebenen Versuchen wurde zur Fällung von Proteinen erst-malig ein Vanadiumsalz verwendet. Der Fällungsverlauf erwies sich als streng von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig und offenbart eine reversible Labilität der Proteinkomplexe. Die Elektrophorese der Lösungen des Nieder-schlags des gesamten Serumeiweißes zeigte das gewohnte und unveränderte Bild der Serumproteine, woraus geschlossen werden kann, daß die biologischen Eigenschaften der Serumproteine durch unsere neue Fällungsmethode wenig oder vielleicht überhaupt nicht verändert worden sind. Die elektrophoretischen Untersuchungen der Niederschläge ergaben fernerhin, daß die Komplexe des Vanadiumsalzes mit den verschiedenen Komponenten des Serumeiweißes ver-schiedene Labilitäten besitzen, die von denen der Uranylacetat-Eiweißkomplexe stark verschieden sind. Auf Grund dessen ist es uns gelungen, auf einfache Wei-se α_1 , β und γ -Globuline aus dem Verband der Serumproteine selektiv abzu-trennen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die entsprechenden Proteinfractionen, z.B. die Albumine und α_2 -Globuline, die bei einer bestimmten Salz-konzentration auszufallen beginnen, in Form dieses Vanadiumsalzkomplexes in viel größerer Menge in Lösung gehalten werden, als ihrer Sättigungskonzen-tration in reinem Zustand entspricht.

Durch die Auffindung von Ammonium-Vanadat als selektives Eiweißfällungs-mittel ist uns eine Substanz in die Hand gegeben, mit der sich noch interes-sante Studien über die Globuline durchführen lassen. Wenn auch unsere Studien an pathologischen Seren keine bemerkenswerten Ergebnisse gezeitigt haben, so bleibt dessen klinische Anwendung jedoch noch offen.

V. Zusammenfassung

- 1) Ammonium-Vanadat, wie andere vorher untersuchte Schwermetallsalze, ist in der Lage, innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches (mit 0,5 %igem Ammonium-Vanadat das pH 2,2 - 4,6, mit 0,4 %igem Ammonium-Vanadat das pH 2,7 - 4,6 und mit 0,3 %igem Ammonium-Vanadat das pH 3,7 - 4,9) aus menschlichem Serum alles Protein auszufällen.
 - 2) Bei Überschreiten dieser pH-Grenzen wird nicht alles Eiweiß gefällt.
 - 3) Im Bereich von pH 1 - 4,7 spielt die Verdünnung des Serums eine große Rolle.
 - 4) Das nichtgefällte Eiweiß je nach pH- und Ammonium-Vanadatkonzentration enthält eine Anreicherung von bestimmten Globulinfraktionen, bzw. bestimmte Globulinfraktionen fehlen völlig darin.
 - 5) Gegenüber Ammonium-Vanadat besteht kein Unterschied zwischen Mischserum und pathologischem Serum.
- — — — —

Literaturangaben

- 1) PAULING und COREY (Über Eiweißstruktur)
Zeitschrift Materia Medica Nordmark,
Mai/Juni 1956
 - 2) SVEDBERG und PEDERSEN
Handbuch Kolloidwissenschaft 7 (1940)
 - 3) V. KAULA
Dtsch. Med. Wschr. 73, 152 (1948)
 - 4) KNÜCHEL
Ztschr. ges. exp. Med. 116, 575 (1951)
 - 5) TISELIUS, A.
Electrophoresis methods for the isolation
and characterisation of biologically im-
portant substances.
3rd. Int. Congr. Microbiol., New York 1939
 - 6) COHN, E. J. U. und EDSALL, I. T.
Proteine aminoacids and Peptidis
New York 1943
 - 7) DIRR
Quantitatives Arbeiten in der Klinik
 - 8) WUHRMANN-WUNDERLY
Die Bluteiweißkörper des Menschen
Benno Schwenke, co Basel
 - 9) SCHWARZENBACH
S. 364 ff. Allgem. u. anorg. Chemie,
Verlag G. Thieme, Stuttgart (1948)
 - 10) GRASSMANN
Med. Mschr. 10, 707 (1951)
-

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. K. Dirr für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die Bereitstellung der für die Arbeit erforderlichen Mittel danken.

Besonders darf ich Herrn Dr. Decker und Frau Dr. Fiedler herzlich für die Problemstellung, Anregungen und für freundliche Hilfe bei der Arbeit und beim Zusammenschreiben danken.

Lebenslauf

Am 26. März 1930 wurde ich in Teheran/Iran geboren als Sohn der Eheleute Seifollah und Äzam Mochkrize.

In Teheran besuchte ich 6 Jahre die Volksschule (Eghbal) und 6 Jahre die Oberschule (Iranschahr). Im Jahre 1950 habe ich von dieser Oberschule das Reifezeugnis bekommen, dann studierte ich 1 Jahr auf der Universität Teheran Pharmakologie und anschließend bin ich zum Medizinstudium nach Deutschland (Heidelberg) gegangen. Nachdem ich während des Wintersemesters 1951/22 im Dolmetscherinstitut Deutsch gelernt hatte, begann ich im Sommersemester 1952 auf der Universität Heidelberg Medizin zu studieren.

Das Physikum legte ich nach 5 vorklinischen Semestern ab und setzte nach diesem Examen auf der Universität München das Medizinstudium fort und begann meine Doktorarbeit bei Herrn Professor Dr. Dr. K. Dirr.

Das Staatsexamen legte ich auch am 13.12.1957 in Heidelberg ab.



